INVESTIGACIONES RECIENTES EN LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PIPAS ARQUEOLÓGICAS DE CHILE CENTRAL

ORLANDO MUÑOZ (1) y RAÚL C. PEÑA (2)

(1) Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Universidad de Chile; omunoz@uchile.cl
(2) Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento Ciencias Vegetales. Pontificia Universidad Católica de Chile; penarc@hotmail.com

ABSTRACTS

In this study we analyzed the tar residues of smoking pipes found in Llolleo complex, La Granja.

We demonstrate that Hairfield and Hairfield's results, which shows the presence of some *Ephedra* species (*E. sinica*) on them are invalid; in first place because this plant doesn't grow in the study site (where the pipes were found). Also, we demonstrate that only terpene type chemical compounds could be found after burning destruction (as it happens when smoking natural substances). To prove it, we burn *Datura stramonium* L. seeds in order to find tropane type alkaloids after; we do the same with *Sophora macrocarpa* seeds and *Ephedra chilensis* C. Presl leaves and stems to seek for isoquinoline alkaloids and Ephedra type protoalkaloids respectively. Results in all three cases were negative.

Keywords: archaeobotany; fumitory pipes; Central Chile.

RESUMEN

En este estudio se analizaron los residuos alquitranados de las pipas encontradas en las excavaciones en el sitio La Granja, Complejo Llolleo. Se demostró que las conclusiones obtenidas por el grupo norteamericano Hairfield y Hairfield sobre la presencia en ellas de especies de *Ephedra* (*E.sinica*) no son válidas, dado que la planta referida no está presente en el sitio de estudio. Hemos demostrado además, que sólo compuestos probablemente terpénicos podrían ser determinados después de la destrucción por combustión, proceso que ocurre cuando se fuman sustancias naturales. Para comprobar la hipótesis anterior se procedió a la combustión de semillas de *Datura stramonium* L. para detectar la presencia posterior de alcaloides de tipo tropano, semillas de *Sophora macrocarpa* Sm. para la presencia de alcaloides isoquinolínicos y tallos y hojas de *Ephedra chilensis* C. Presl que se consideran fuente de protoalcaloides del tipo *Ephedra*; en los tres casos los resultados fueron negativos.

Palabras clave: Arqueobotánica, pipas; Chile Central.

INTRODUCCIÓN

En un estudio conjunto entre químicos de la Universidad de Chile y del Mary Badwin College de EE. UU., el grupo norteamericano ha sugerido que los residuos alquitranados de las pipas encontradas en el sitio La Granja correspondiente al Complejo arqueológico Llolleo, Chile Central (Figuras 1-3), podría tratarse de protoalcaloides tipo efedra, según se desprende de un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de Masas y análisis complementario usando el modelo Ma Huang (*Ephedra sinica* Stapf), es decir, una efedra con alcaloides o protoalcaloides relacionados (Hairfield y Hairfield 2002).

La colección de pipas en el sitio de La Granja corresponde a la ribera norte del río Cachapoal, a unos 100 Km. S de Santiago y encontradas por el grupo de Planella y Tagle (1998), y su data es de alrededor de 100 años AC.

Los Hairfield (Hairfield y Hairfield 2002), igualmente realizaron los análisis de comparación del

residuo alquitranado de las pipas, con plantas chilenas que fueron extraídas y analizadas y que se sabe contienen alucinógenos. De esta forma, analizaron los residuos de cenizas, de *Peumus boldus* Molina, *Cryptocarya alba* (Molina) Looser, *Latua pubiflora* (Griseb.) Baill., *Fabiana imbricata* Ruiz y Pav., *Lobelia tupa* L., *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz, incluyendo además, tabaco chileno (*Nicotiana tabacum* L.) y dos especies de plantas del género *Anadenanthera: Anadenanthera colubrina* var. cebil (Griseb.) Reis Altschul y A. *peregrina* Speg. (cf. Hairfield y Hairfield 2002), todas alcaloideas con la sola excepción de *Fabiana imbricata.*

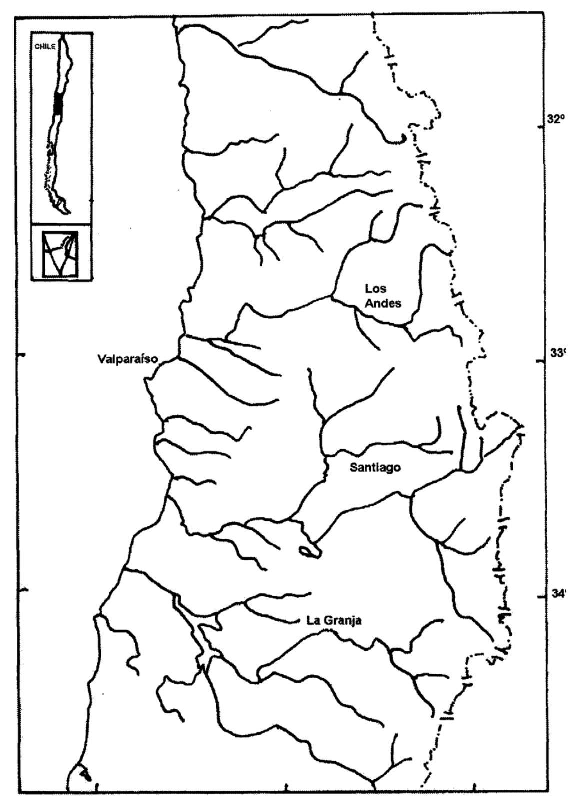


FIGURA 1. Mapa de las regiones donde se realizaron las excavaciones arqueológicas.



FIGURA 2. Tipos de Pipas con la boca en forma de T recuperados del sitio La Granja.

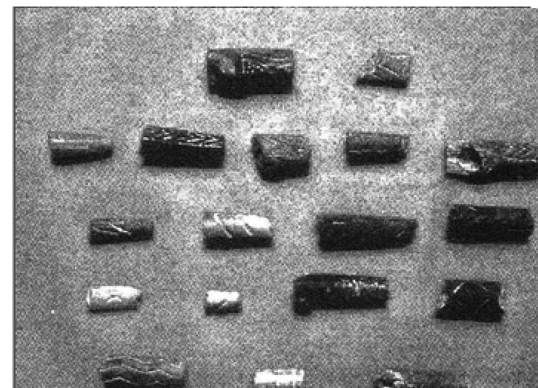


FIGURA 3. Variedad de decoraciones por grabado.

La presencia de acetamida y los resultados positivos de detección de alcaloides demostrarían que los aborígenes fumaron material botánico que contenía alcaloides. Este ha sido el supuesto de los Hairfield y como el test de *Ephedra sinica* Stapf (efedra o Ma Huang), que contiene alcohol bencílico y dos de los mismos ftalatos que contenían las pipas, entonces estos autores han postulado que los aborígenes del sitio La Granja fumaban probablemente, compuestos de composición similar a efedra, por tanto, sugieren la presencia de una "efedra" en muestras de pipas de sitio de La Granja al comparar los espectros del residuo alquitranado extraído del material arqueológico con material comercial de "Ma-Huang" a base de *E. sinica*. Falabella y Planella (2001) han descartado tal identificación y también la presencia de *Anadenanthera*; en parte porque el test de "Ma-Huang" no es homologable con *E. chilensis* C.Presl y por la misma razón, la presencia geográfica de *Anadenanthera.*

Aparte de los estudios realizados en *Ephedra "andina"* por Morales *et al*. (2003), en la zona norte de Chile, no existen indicios que *E. chilensis* (non *E.andina* Poepp. ex C.A.Mey.) contenga alcaloides. Estudios realizados en la misma especie en variadas épocas del año por Erazo, han demostrado igualmente la ausencia de alcaloides.

Una reciente investigación relacionada con el análisis metabolómico de especies de *Ephedra* utilizando ^{1}H-NMR y análisis de multivarianza ratificó dichos resultados (Erazo ms.). Por otra parte, la presencia de terpenos

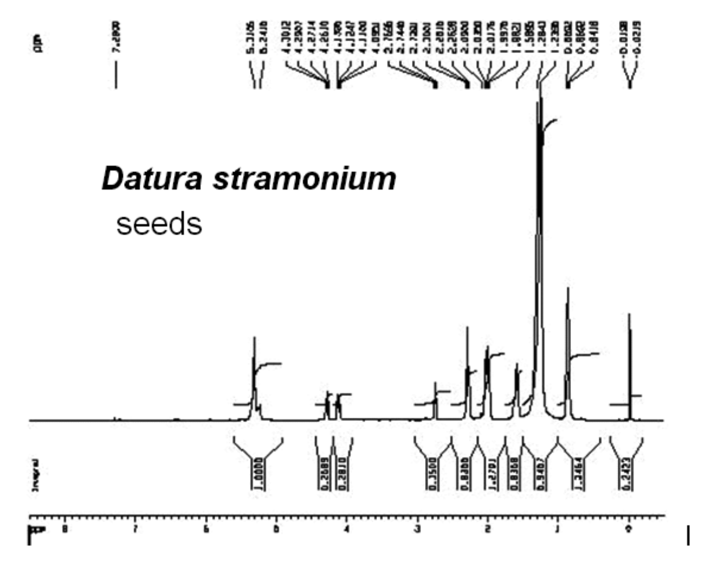


FIGURA 4. Espectros de resonancia magnética nuclear de pirolizados de semillas *Datura stramonium*

diversos en el estudio de los Hairfield, podría deberse a la presencia de boldo, que contiene cantidades variables de ascaridol, α careno, mirceno etc.

Pochettino *et al*. (1999) han sugerido la presencia de *N, N* dimetiltriptamina en taxa del género *Anadenanthera* y de la familia Myristicaceae ninguno de estos grupos taxonómicos existen dentro del área de estudio. No obstante, entre las plantas de la zona en cuestión, "mayu" (*Sophora macrocarpa* Sm.) y "miyaye" (*Datura stramonium* L.), son fuentes de sustancias alucinógenas y no fueron consideradas como material de referencia (*cf.* Planella *et al.* 2007).

Torres *et al*. (1991), de igual modo, detectaron bufotenina en material arqueológico de Atacama, sugiriendo una difusión de la especie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, desde el sur-norte argentino y que además permitiría distinguirla de Virola, este última usada en la Amazonía como fumatorio y que a la fecha no le sido ha descrito la presencia de este compuesto.

Gurny y Wagner (1984) han establecido, que la sección de *Ephedra* americana, carece de alcaloides del tipo efedrano. *Ephedra chilensis* C. Presl contiene taninos condensados al igual que otras especies del género en Argentina. Por otro lado, grupos de investigadores independientes, Ricco *et al.* (2002), Huang *et al.* (2005) han determinado una clara distinción de la sección americana de *Ephedra*, quienes además agregan que la sección euroasiática es rica en alcaloides.

El objetivo de este trabajo ha sido agregar evidencias adicionales experimentales y demostrar la posible presencia o ausencia de residuos de alcaloides atribuibles a sustancias presentes en las pipas arqueológicas del sitio de La Granja, en Chile central.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal. Tallos y hojas de *Ephedra chilensis* (500 g) fueron recolectados en Farellones (Chile Central) en enero de 2005. Se depositó un ejemplar testigo en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia Universidad de Chile (Nº 22234 Muñoz s.n. SQF).

General. Las cromatografías en capa fina se desarrollaron sobre gel de sílice 60 GF_{254} (Merck 5554) con i) Me_2CO-NH_4OH (20:1), ii) CHCl3-Me2CO (1:2), iii) $CHCl_3$-Me_2CO-NH4OH (18:5:2) y sobre óxido de aluminio 60 F254 con iv) Et_2O-EtOH (95:2). Las manchas fueron detectadas por radiación UV o por aspersión del reactivo de Dragendorff. Las cromatografías preparativas se realizaron sobre placas de gel de sílice F254 de 2 mm (Merck 7731).

Aislamiento de los alcaloides. Tallos y hojas fueron extraídas (190g) con etanol a temperatura ambiente; se

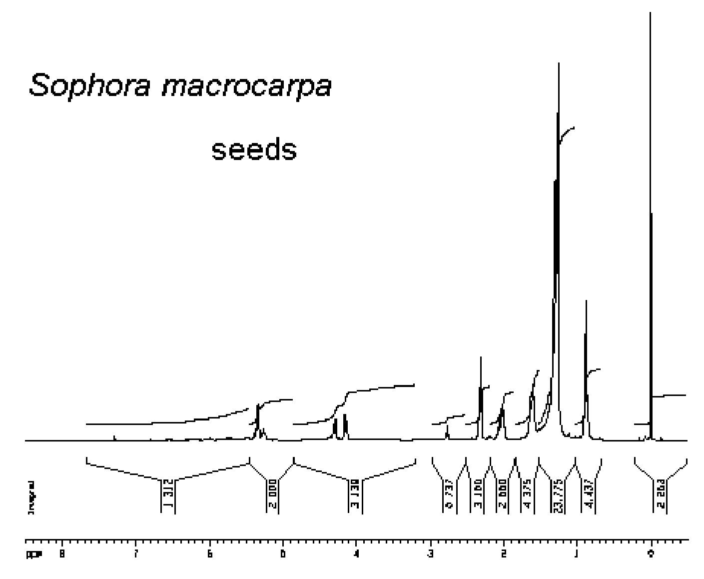


FIGURA 5. Espectros de resonancia magnética nuclear de pirolizados de semillas de Sophora Macrocarpa.

filtraron y se llevaron a sequedad. El residuo se recuperó con HCl 0,1 M y el extracto acuoso ácido fue lavado con éter etílico. La solución acuosa fue basificada a pH 12 con NH_4OH y extraída con diclorometano dando un residuo gomoso (6,6g). El material básico se sometió a CC repetidas en gel de sílice (5-40 µm) y óxido de aluminio usando mezclas hexano-EtOAc-MeOH y hexano-EtOAc respectivamente.

Análisis ^{1}H-NMR. Las muestras fueron disueltas en CDCl3 y los espectros tomados a 300MHz en un aparato Bruker AMX.

Los análisis de espectrometría de masa se efectuaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 series II acoplado a un detector de masas selectivo HP 5972 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El detector ms se uso en modo ionización de impacto electrónico (El) a 70 eV. Los espectros de masas se registraban en el rango m/z 30-400 Th a 1.3 scan/s y la transferencia de la línea de ms se estableció a 280°C. el instrumento estaba equipado con inyector split/splitless a 250°C que emplea control de presión electrónico (EPC) en flujo constante (He, 1 mL/min). El largo de Columna 25,00m, diámetro, 0,200m. Column –Ultra 1.

Pirólisis de material botánico.

Se pesaron 5 g de semillas de *Sophora macrocarpa* y 5 g de *Datura stramonium*, y 5 g de partes aéreas de *Ephedra chilensis*. Se trituraron a tamaño de partícula inferior a 1 mm, se vertieron en un crisol de porcelana y se cubrieron con arena inerte. Se calentaron en mufla a 220º C durante 20 minutos. Se disolvieron en diclorometano, filtraron y luego se tomaron los espectros de RMN para cada muestra (Kim *et al*. 2005).

La determinación de efedrina se realizó según el método de Kim *et al*. (2005) (Figura 5).

Material arqueológico.

La colección de pipas del sitio de La Granja, (Región Metropolitana, SO. de Santiago de Chile Figura 1) incluyó fragmentos cerámicos y en piedra (Figura 2) que tienen variedad de dimensiones, formas, y diseños decorativos (Falabella y Planella 2001). Desde el punto de vista morfológico corresponden a pipas en forma de T invertida, pero con variaciones de medidas.

La determinación de alcaloides, se realizó en tres plantas adicionales a las ya analizadas por Hairfield: *Sophora macrocarpa*, planta alucinógena por su alto contenido en citisina, *Datura stramonium* que contienen alcaloides del tipo del tropano (Gunckel 1951), ambas de existencia prehispánica (Falabella y Planella 2001) y *Ephedra chilensis*, planta no relacionada con la sección asiática del género (Ricco 2002).

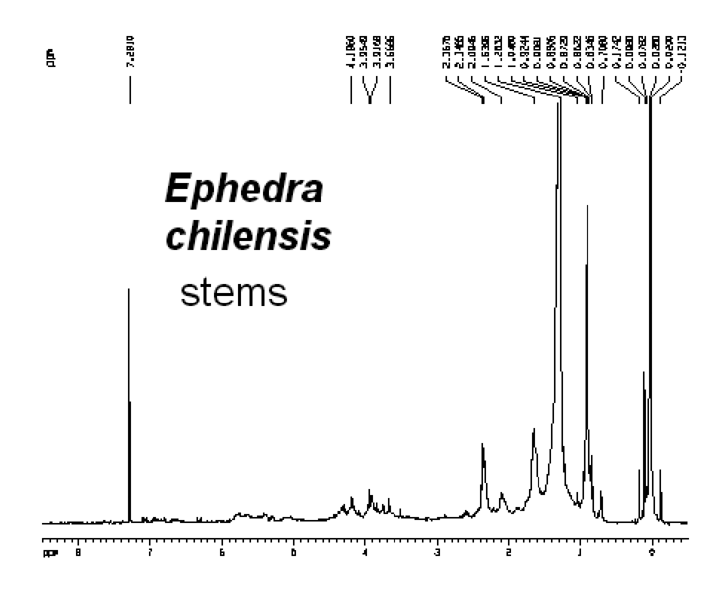


FIGURA 6. Espectros de resonancia magnética nuclear de pirolizados de *Ephedra chilensis*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha realizado un análisis sistemático de alcaloides en *Ephedra chilensis* C. Presl. (*non E.andina*) (Figura 6) y no se ha detectado la presencia de alcaloides, ratificando de esta forma estudios previos de Silvia Erazo (ms.) y de Gurny y Wagner (1984) respectivamente, por lo que suponemos que los estudios de Morales *et al*. (2003) debiera corresponder a otra especie. La marcha analítica para la detección de alcaloides y los métodos de detección por reactivo de Dragendorff y Meyer, no mostraron vestigios de base alguna. Posterior análisis por espectrometría de masa, no reveló presencia ni modelos de fragmentación que indicara bases del tipo efedrina o relacionados sino modelos de fragmentación de aminoácidos minoritarios.

La presencia de 2(etilhexanol) ftalato en *Ephedra* y ftalato de dietilo en boldo, detectada por los Hairfield utilizando el reactivo de Dragendorff no son concluyentes, ya que la reacción de Dragendorff no discrimina sólo alcaloides, y por tanto, podría tratarse de β sitosterol; además los ftalatos típico plastificante que se encuentra en los solventes y que se concentran cuando se estudian compuestos minoritarios, suelen dar positivo al test mencionado. Por otra parte, el tratamiento térmico de semillas, constituye una metodología usual en los estudios arqueobotánicos. Y en caso de los artefactos recuperados que corresponde a residuos alquitranados, sólo se puede emular con restos carbonizados de material autentificado. Cada planta recuperada arqueológicamente representa su propia historia y cronología. De esta forma, la presencia de *Datura stramonium* (Figura 5) y *Sophora macrocarpa* (Figura 6), no parece ser posible, ya que los probables alcaloides (escopolamina o citisina y relacionados), no se detectan y no logran persistir al tratamiento térmico y sus espectros protónicos así lo demuestran, al exhibir modelos similares de alcoholes de cadena larga. Las partes aéreas de E. *chilensis*, planta supuestamente presente en el lugar, no permitió tampoco identificar alcaloides porque se destruyen o se transforman en el proceso y por último esta planta no contiene alcaloides.

La determinación de ftalatos de diversa naturaleza se podría considerar como un resultado de compuestos producidos al quemar algunos compuestos naturales y que no corresponden necesariamente a compuestos que permitan diagnosticar alguna especie botánica. El boldo es un vegetal que podría haber estado presente en el fumatorio, ya que además de ftalatos se le ha descrito la presencia de compuestos terpénicos en el residuo alquitranado, presenta además aceites esenciales cuyos compuestos terpénicos han sido detectados en algunas muestras de las pipas, uno de ellos fue ascaridol compuesto relacionado estructuralmente con nicotina y posible

alucinógeno. Análisis por ^{1}H-NMR de los residuos alquitranados y de restos carbonizados según la técnica de Rosen y Olson (1985), mostró en *Datura stramonium* y *Sophora macrocarpa* sólo la presencia de alcoholes monoterpénicos similares a los ya descritos por Hairfield (Figuras 4 y 5). En tanto *Ephedra chilensis* no mostró presencia alguna de bases de efedra o derivados (Figura 6).

La presencia de acetamida detectada por Harfield y Harfield (2002) puede atribuirse a compuestos de descomposición de los alcaloides de *Nicotiana* (*N. tabacum o N. rustica* L.). Los alcaloides nicotínicos son difíciles de pesquisar, mediante la reacción de Dragendorff y claramente no sobreviven al efecto térmico. Esta planta ha sido detectada en algunos sitios de la Región de Chile central. Sin embargo, Planella y Tagle (1998) no han detectado sus semillas en yacimientos del sitio de La Granja.

En resumen, el extracto de planta de *E. chilensis*, carece de sustancia alcaloidea. Por tanto la afirmación de Hairfield y Harfield (2002), para validar presencia de alguna efedra en las pipas encontradas, carece de validez.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Fernanda Falabella y María Teresa Planella la cesión de fotografías originales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVENEY, S. CHARLET, D.A. HELMUT FREITAG, H. MAIER-STOLTE, M. y STARRATT, A. N.
2001 New Observations on the Secondary Chemistry of World *Ephedra* (Ephedraceae). American Journal of Botany 88: 1199-1208.

ERAZO, S.
1989 Comunicación personal.

FALABELLA, F. PLANELLA, M. T. y TAGLE, B.
2001 Pipe e tradizione di fumare nelle societa preispaniche del periodo agroceramicolo precoce nella regione centrale del Cile. Eleusis NS 5: 137-151.

GUNCKEL, H.
1951 Algunas anotaciones botánicas sobre dos especies adventicias del género *Datura* L., observadas en la región de Santiago (Chile). Anales de la Academia Chilena de Ciencias Naturales 36: 271-276.

GURNI, A. A. y WAGNER, M. L.
1984 Proanthocyanidins from some Argentine species of *Ephedra*. Biochemical Systematic and ecology 12: 319-320

HAIRFIELD, H. JR. y HAIRFIELD, E.
2002 Smoking out the past Anthropology uses GC-MS to determine the botanical origins of residue in ancient clay pipes from Chile. Chemist Today. 11: 27.

HUANG, J. GIANNASI, D. E. y PRICE, R. A.
2005 Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 35:48–59

KIM, H. K. HAE CHOI, Y. ERKELENS, C. ALFONS LEFEBER, A . y VERPOORTE, R.
2005 Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using 1H-NMR spectroscopy and principal component analysis. Chemical & Pharmaceutical Bulletin 53: 105-109.

MORALES, G. SIERRA, P. MANCILLA, A. PAREDES, A. y LOYOLA, L. A. GALLARDO, O. y BÓRQUEZ, J.
2003 Secondary metabolites from four medicinal plants from northern Chile: antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*. J. Chil. Chem. Soc. 48: 13-18.

PLANELLA, M. T. PEÑA, R. C. FALABELLA, F. y MCROSTIE, V.
2006 Búsqueda de nexos entre prácticas funerarias del Período Alfarero temprano del Centro de Chile y usos etnográficos del “miyaye”. Historia Indígena 9: 33-49.

PLANELLA, M. T. y TAGLE, B.
1998 El sitio Agroalfarero de La Granja: un aporte desde la perspectiva arqueobotánica. Publicación Ocasional 52. Museo Nacional de Historia Natural de Chile, DIBAM, Santiago, 25 p. + 33 s/f.

POCHETTINO, M. L . CORTELLA, A.R. y RUIZ, M.
1999 Hallucinogenic snuff from Northwestern Argentina: Microscopical identification of A*nadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae) in powdered archaeological material. Economic Botany 53: 127-132.
RICCO, R. A. SENA, G. VAI, V. M. WAGNER, M. L. y GURNI, A. A.
2006. Taninos Condensados de *Ephedra frustillata* Miers (Ephedraceae). Acta Farm. Bonaerense 25 (2): 192-197.
ROSSEN, J. y OLSON, J.
1985 The controlled carbonization and archeological analysis of SE US wood charcoal. Journal of Field Archaeology 12: 445-456.
TORRES, C. M., REPKE, D. B. CHAN, K. MCKENNA, D. LLAGOSTERA, A. y SCHULTES, R. E.
1991 Snuff powders from pre-Hispanic San Pedro de Atacama: Chemical and contextual analysis Curr. Anthropol. 32: 640 -649. http://www.jstor.org/view/00113204/dm991489/99p0236z/0 acceso 5. 11. 2006

Contribución recibida: 20-mar-2009.
Contribución aceptada: 11-jul-2009.